

File 1:ERIC 1966-1997/Mar  
(c) format only 1997 Knight-Ridder Info

Set Items Description  
-----

?b 351

06may97 14:09:06 User105551 Session D189.1  
Sub account: 006910.0908 POSORSKE  
\$0.36 0.012 Hrs File1  
\$0.36 Estimated cost File1  
\$0.14 SPRNTNET  
\$0.50 Estimated cost this search  
\$0.50 Estimated total session cost 0.012 Hrs.

File 351:DERWENT WPI 1981-1996/UD=9718;UA=9715;UM=9710  
(c)1997 Derwent Info Ltd

\*File 351: \*\*\* WPI will be offline between 4pm and 5pm PDT today  
in preparation for the release of the reloaded database. \*\*\*

Set Items Description  
-----

?S PN=JP 3076583

S1 1 PN=JP 3076583

?

t s1\9/all

1/9/1

DIALOG(R) File 351:DERWENT WPI

(c)1997 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

008633930 WPI Acc No: 91-137960/19

XRAM Acc No: C91-059664

Expression of human protein in blue-green algae - comprises inserting  
e.g. recombinant plasmid contg. amino acid sequence for human  
superoxide dismutase into algal cells

Index Terms: EXPRESS HUMAN PROTEIN BLUE GREEN ALGAE; COMPRISE RECOMBINATION  
PLASMID CONTAIN AMINO ACID SEQUENCE HUMAN SUPER OXIDE DISMUTASE ALGAE  
CELL INSERT

Patent Assignee: (TOKY-) TOKYO YAKUJIN KAIHA

Number of Patents: 001

Patent Family:

CC Number	Kind	Date	Week
JP 3076583	A	910402	9119 (Basic)

Priority Data (CC No Date): JP 89210129 (890816)

Abstract (Basic): JP 3076583

A recombinant plasmid or an expressing DNA fragment, which  
contains a DNA sequence of coding for a polypeptide having the same  
amino acid sequence as human superoxide dismutase, is inserted into  
blue-green alga cells, and the transformant blue-green alga cells are  
incubated in a medium to produce the polypeptide.

The polypeptide to be produced by the process has a specific  
amino acid sequence of 153 amino acids.

USE/ADVANTAGE - Industrial and biotechnological mass-prodn. of a  
human protein (human superoxide dismutase, h-SOD) is possible. @(13pp  
Dwg.No.0/0)@

File Segment: CPI

Derwent Class: B04; D16;

Int Pat Class: C07K-013/00; C12N-001/13; C12N-015/74; C12P-021/02;

C12R-001/89

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B02B3; B04-B02C2; B04-B04A1; D05-C03B; D05-H12

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* M423 M720 M903 N132 N135 Q233 V802 V811

\*02\* M423 M710 M903 N135 Q233 V753

?

TOKYO PHARM. DEVELOP. 4/2/91 #3,076,583  
 EXPRESSION OF HUMAN PROTEIN IN  
 CYANOBACTERIUM

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

平3-76583

⑨ Int. Cl. 3	識別記号	庁内整理番号	⑭ 公開	平成3年(1991)4月2日
C 12 N 15/74	ZNA	8619-4H	C	HIDEAKI OGIWARA (HAGIWARA)
C 07 K 13/00				
C 12 N 1/13				
C 12 P 15/53				
C 12 P 21/02	C	8214-4B	C 12 N 15/00	YASUNARI TAKEJIMA (KOJET)
C 12 N 1/13				
C 12 R 1:89				
(C 12 P 21/02)				
C 12 R 1:89		8717-4B		A
		8717-4B		A

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全13頁)

⑬ 発明の名称 ヒトタンパク質のラン藻での発現方法

⑮ 特 願 平1-210129

⑯ 出 願 平1(1989)8月16日

⑰ 発 明 者 萩原 秀昭 兵庫県加西市別府町甲1556  
 ⑱ 発 明 者 竹嶋 康誠 兵庫県加西市別府町甲1556  
 ⑲ 出 願 人 萩原 義秀 兵庫県宝塚市平井山荘4-14  
 ⑳ 出 願 人 東京薬品開発株式会社 東京都千代田区鍛冶町1-7-2 松田ビル2F  
 ㉑ 代 理 人 弁理士 小田島 平吉 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

ヒトタンパク質のラン藻での発現方法

2. 特許請求の範囲

1. ヒト・スーパーオキシドジスムターゼと実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNA配列が導入された組換えプラスミドまたは発現可能なDNA断片で形質転換されたらん藻細胞を培地で培養することを特徴とするらん藻細胞における上記ポリペプチドの発現方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明はヒト・スーパーオキシドジスムターゼ(以下、h-SODと省略する)と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNA配列をらん藻細胞内で発現させる方法に関する。

〔従来の技術〕

ヒト・スーパーオキシドジスムターゼ(h-

SOD)は生体内に生じる活性酸素(O<sub>2</sub><sup>-</sup>、<sup>1</sup>O<sub>2</sub>、OH<sup>-</sup>など)の濃度を低下させ、生体成分が非特異的に酸化されるのを防ぐ機能をもつと考えられている。そのことから、h-SODは炎症など活性酸素が関与する病気(例えば慢性関節リウマチ、変形性関節炎、放射線・紫外線照射による障害、血球部分への血液再流に伴う障害など)に有効な治療薬として注目されている。

ヒト赤血球Cu/Zn-SODについてはそのアミノ酸配列が報告され [Jabusch et al., Biochemistry, 19 (1980) 2310-2316, Barra et al., FEBS Letters, 120 (1980) 53-55]、また、ダウン症候群患者に由来する樹立細胞株より分離されたmRNAから得られたcDNAの塩基配列についても調べられている [Sherman, L. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 80 (1983) 5465-5469]。また、h-SODは遺伝子操作により大腸菌、酵母での発現も報告されており、 [R. A. Hallewell et al. Nucleic Acid Research 13, (6) (1985) 2017-2034, R. A.

Ogiwara, H (1991)

M

Hallewell et al. Bio/Technology. 5 (1987) 363-366]、組換え h-SOD の大腸菌、酵母による大量生産も可能になっている。

一方、らん藻細胞は、光と少量の無機塩類を含む水とがあれば増殖することが可能であり、培養が簡単であるため、遺伝子操作のための宿主として好適であると考えられる。

従来、らん藻細胞を宿主として遺伝子操作を行った例としては、アナキステイス・ニデュランス (Anacystis nidulans) にアンピシリンおよびクロラムフェニコール耐性遺伝子、アナキステイス・ニデュランスの rRNA 遺伝子およびリブローズニリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) 遺伝子を導入したもの [C. J. Kuhlensieper et al., Mol. Gen. Genet. 184: 249-254 (1981); S. S. Golden and L. A. Sherman, J. Bacteriology 155: 966-972 (1983); H. Danielli et al., Arch. Microbiol. 151: 59-64 (1989)]、アナベナ (Anabaena) にク

キンドジスムターゼと実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする DNA 配列が導入された組換えプラスミドまたは発現能力をもつ DNA 断片で形質転換されたらん藻細胞を培地で培養することを特徴とするらん藻細胞における上記ポリペプチドの発現方法が提供される。

ヒト・スーパーオキシドジスムターゼ (h-SOD) は、153個のアミノ酸から構成されるポリペプチドであり、そのポリペプチド部分のアミノ酸配列は次のとおりである。

1	10
Ala Thr Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly	
20	
Asp Gly Pro Val Glu Gly Ile Ile Asn Phe	
30	
Glu Glu Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys	
40	
Val Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu	
50	
Gly Leu His Gly Phe His Val His Glu Phe	
60	
Gly Asp Asn Thr Ala Gly Cys Thr Ser Ala	
70	

ロラムフェニコール、ストレプトマイシン、ネオマイシンおよびエリスロマイシン耐性遺伝子を導入したもの [C. P. Wolk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1561-1565 (1984)]、シネコシステイス (Synechocystis) にカナマイシン耐性遺伝子を導入したもの [F. Chauvat et al., Mol. Gen. Genet. 216: 51-59 (1989)] 等が知られているが、原子動物であるらん藻細胞にヒト又は動物の遺伝子を組み込み、それを発現させることに成功した例は未だ報告されていない。

本発明者らは、遺伝子組換え技術による h-SOD 遺伝子の発現のための宿主としてらん藻細胞を用いることに着目し、鋭意研究を行なった結果、今回、h-SOD 遺伝子を載る種のベクターまたは発現能力を持つ DNA 断片に導入し、得られる組換えプラスミドまたは DNA 断片でらん藻細胞を形質転換し、h-SOD を発現させることに成功し、本発明を完成するに至った。

かくして、本発明によれば、ヒト・スーパーオ

Gly Pro His Phe Asn Pro Leu Ser Arg Lys	
	80
His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu Arg His	
	90
Val Gly Asp Leu Gly Asn Val Thr Ala Asp	
	100
Lys Asp Gly Val Ala Asp Val Ser Ile Glu	
	110
Asp Ser Val Ile Ser Leu Ser Gly Asp His	
	120
Cys Ile Ile Gly Arg Thr Leu Val Val His	
	130
Glu Lys Ala Asp Asp Leu Gly Lys Gly Gly	
	140
Asn Glu Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn Ala	
	150
Gly Ser Arg Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly	
Ile Ala Glu	

本明細書において「ヒト・スーパーオキシドジスムターゼと実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド」とは、上記アミノ酸配列を有する h-SOD ポリペプチドの他に、h-SOD とし得る酵素活性を実質的に失うことがない範囲内で、上記 153 個のアミノ酸の一部（一般には 5

3-76583(2)

マイシン、ネオ  
 耐性遺伝子を導  
 1., Proc. Nat  
 1561-15  
 ステイス (Synec  
 遺伝子を導入した  
 ol. Gen. Gene  
 9)] 等が知ら  
 ん菌細胞にヒト又  
 れを発現させるこ  
 ていない。  
 技術によるh-S  
 としてらん菌細胞  
 究を行なった結果、  
 のベクターまた  
 導入し、得られる  
 断片でらん菌細胞  
 見させることに成  
 た。

ヒト・スーパーオ

Leu Ser Arg Lys  
 80  
 Glu Glu Arg His  
 90  
 Val Thr Ala Asp  
 100  
 Val Ser Ile Glu  
 110  
 Ser Gly Asp His  
 120  
 Leu Val Val His  
 130  
 Gly Lys Gly Gly  
 140  
 Thr Gly Asp Ala  
 150  
 Gly Val Ile Gly

スーパーオキシドジ  
 アミノ酸配列を有す  
 アミノ酸配列を有す  
 2に、h-SODとし  
 うことがない範囲内  
 の一部(一般には5

個以下、好ましくは2個以下)が他のアミノ酸と  
 置き換ったh-SODに類似するポリペプチド(以  
 下、h-SOD類似体という)をも包含する意味  
 で使用するものである。そのようなh-SOD類  
 似体の具体例としては、例えば、

- (a) h-SODの6番目のシステイン残基  
 (Cys)がアラニン残基(Ala)に置き換っ  
 たもの(特願昭63-311013号明細  
 書参照)、
- (b) h-SODの111番目のシステイン残基  
 (Cys)がセリン残基(Ser)に置き換っ  
 たもの(特昭62-130684号明細  
 書参照)、
- (c) h-SODの6番目のシステイン残基  
 (Cys)がアラニン残基(Ala)に、そし  
 て111番目のシステイン残基(Cys)が  
 セリン残基にそれぞれ置き換ったもの(特  
 公昭63-273473号明細書参照)

等が挙げられる。  
 ヒト・スーパーオキシドジスムターゼと実質的

40  
 GTT TGGGGTTCTA TCAAAGGCCCT GACCGAA  
 CAA ACCCCAAAGAT AGTTTCCGGA CTGGATT  
 50  
 GGT CTGCATGGAT TCCATGTTC A TGAATTT  
 CCA GACGTACCTA AGGTACAAGT ACTTAAA  
 60  
 GGT GACAACACTG CAGGTTGCAC CTCTGCA  
 CCA CTGTTGTGAC GTCCAACGTC GAGACGT  
 70  
 GGG CCTCATTTC A ACCCGTGTG CCGTAAA  
 CCC GGAGTAAAGT TGGCCGACAG CGCATT  
 80  
 CATGGTGGGCGGA AAGACGAAGA ACOTCAT  
 GTACCACCCGGCT TTCTGCTTCT TGCAGTA  
 90  
 GTT GGTGACTAGG TAACGTTACC GCTCAC  
 CAA CCACTGATCC ATTGCAATGG CGACTG  
 100  
 AAAGACGGTGTGCG TGACGTTTCT ATCGAA  
 TTTCTGCCACAGCG ACTGCAAAGA TAGCTT  
 110  
 GACT CTGTTATCTC TCTGTCTGGT GACCAT  
 CTGA GACAATAGAG AGACAGACCA CTGGTA  
 120  
 TGCATCATCGGTCG TACTCTGGTT GTTCAT  
 ACCTAGTAGCCAGC ATGAGACCAA CAAGTA  
 130  
 GAAA AAGCGGATGA CCTGGGTAAA GGTGGT  
 CTTT TTCGCCTACT GGACCCATTT CCACCA

に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド(以  
 下、本件ポリペプチドという)をコードするDN  
 A配列はそれ自体既知の遺伝子操作技術によつて  
 容易に合成することができ、例えば下記の文献:

- (1) 日本生化学会編 「脱生化学講座1遺伝子  
 研究法II」 東京化学同人刊(1987年)
- (2) 村公正実編 「医学における遺伝子工学」  
 東京化学同人刊(1987年)

等の実験書に記載されている方法によつて合成す  
 ることができる。

このようにして合成されるh-SODをコード  
 するDNA配列の一例を示せば次のとおりである。

1  
 GCT ACCAAAGCTG TTTGCGTTCT GAAAGGT  
 CGA TGGTTTCGAC AAACGCAAGA CTTTCCA  
 20  
 GACGGCCCCGGTTC AGCGTATCAT CAACTTC  
 CTGCCGGCCCAAG TCCCATAGTA GTTGAAG  
 30  
 GAA CAGAAAAGAT CTAACGGTCC GGTAAAA  
 CTT GTCTTTCTTA GATTGCCAGG CCAATTT

140  
 AACCAGGAATCTAC CAAAACCGGT AACGCT  
 TTGCTCCTTAGATG GTTTTGGCCA TTGCGA  
 150  
 GGTT CTCGCTCTGGC ATGCGGTGTT ATCGGT  
 CCAA GAGCAGACCG TACGCCACAA TAGCCA  
 ATCGCTCAG  
 ATGCCGAGTC

なお、上記DNA配列の上流側末端には適宜、  
 ノチオンをコードする ATG が結合していても  
 よい。

上記DNA配列はあくまでも一実施形態であり、  
 前記のアミノ酸配列をコードするものである限り、  
 DNA配列は変更可能であることはいうまでもな  
 い。

また、前記(a)のh-SOD類似体をコードす  
 るDNA配列の一例としては、上記h-SODを  
 コードするDNA配列の点線で囲んだ部分を GCT  
 CGA  
 に置き換えたものを例示することができる。

このようにして合成される本件ポリペプチドを  
 コードするDNA配列は次いで適当なベクターま

たは発現能力をもつDNA断片に組み込む。そのために使用しうるベクターまたは発現可能なDNA断片としては、らん藻細胞に導入可能なものであれば特に制限されるものではなく広範囲の種類のベクターまたはDNA断片から選ぶことができ、プラスミド及びウイルスから必要に応じて誘導することができる。ベクターは単コピーベクター又は低コピーもしくは高コピーベクターのいずれであつてもよく、クローニング及び/又は発現のために機能するものである。ベクターに関しては多くの文献が存在し、また、多くのベクターまたはDNA断片は商業的に入手可能である。これらのベクターまたは発現可能なDNA断片は通常、選択を可能にするマーカーを含有し、このマーカーとしては細菌耐性、栄養要求性などがあり、しばしば異なる特性をもたらす多数のマーカーを1ベクターまたは1DNA断片に使用される。また、発現ベクターまたは発現可能なDNA断片の場合には転写開始および停止の両制御シグナルが存在する。

用いることも可能である。プロモーターは *tac* プロモーターの他、*glnA* プロモーター (*Anabaena*)、*ps2B* プロモーター (*Fremyella*)、*rbc* プロモーター (*Anacystis*)、*rRNA* プロモーター (*Anacystis*)、*atp1*、*atp2* プロモーター (*Anabaena*, *Synechococcus*)、*petF1* プロモーター (*Anabaena*, *Synechococcus*)、*cpcB1A1E* プロモーター (*Calothrix*)、*cpc* プロモーター (*Synechococcus*, *Anabaena*)、*sod* プロモーター (*Anacystis*) などが挙げられる [N. E. T user et al., *Nature*, 306: 337~342 (1983); B. Mulligan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81(9): 2693~2697 (1984); 熊野正信、杉浦昌弘、「遺伝」38(12)26~31(1984); S. E. Curtis, *Photosynthesis Research*, 18: 223-244 (1988); J. V. D. Plas et al., *Photosynthesis Research*, 18: 179-204 (1988); N. T. D. Marsac et al., *Photosynthesis Research*]

このような有利に利用できる発現用ベクターとしては、例えば *plac 11* (ATCC 37145)、*plac 12* (ATCC 37138)、*pKK 223-3* などの *ptac* プロモーター [H. A. deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 21 (1983)] を含有するベクター; *pAH 5*、*pAH 9* などの *ADC 1* プロモーターを含有するベクター; プラスミド *pSV 2* などの *SV 40* 系ベクター等が挙げられる。さらに、らん藻細胞用のベクターとして「植物遺伝子操作技術-遺伝子組換えと細胞融合-」山口啓之監修 (シーエムシー刊) 98~110頁に記載されているプラスミド *pBAS 18*、*pUC 104*、*pUC 105*、*pUC 303* 等もまた使用可能である。

本件ポリペプチドをコードするDNA配列をらん藻細胞に導入するためのベクターまたは発現可能なDNA断片プロモーター、オペレーター、*SD* (Shine-Dalgarno) 配列、翻訳開始コドン; 終止コドン、ターミネーターがこの順に配置されていることが必要である。プロモーターは1つである必要はなく、2つのプロモーターを並列させ

8: 99-132 (1988); D. E. Lauderbach et al., *Mol. Gen. Genet.* 216: 455-461 (1989)]。

一方、本件ポリペプチドが導入された組換えベクターまたは発現可能なDNA断片を組み込むことのできるらん藻細胞としては、例えばアナキステイス・ニデュランズ (*Anacystis nidulans*)、アグメネルム・クオドルプリカトゥム (*Agmonellum quadruplicatum*)、アナベナ (*Anabaena*)、ネンジュモ (*Nostoc*)、ユレモ (*Oscillatoria*)、スピルリナ (*Spirulina*)、イトヒゲモ (*Calothrix*)、フレミィエラ (*Fremyella*)、スイゼンヅノリ (*Aphanotheca*)、アイミドリ (*Brachytrichia*)、シネコシステイス (*Synechocystis*) 等が挙げられ、それぞれの宿主に適したベクターまたは発現可能なDNA断片を選択使用することにより、形質転換らん藻細胞を造成することができる。

本件ポリペプチドをコードするDNA配列と適当なベクターまたはDNA断片とからの組換えプ

-76583(4)  
 用ベクターと  
 (7145)、*ptac*  
 の *ptac* プロ  
 Proc. Natl.  
 を含有するベ  
 C101プロモー  
 ミド pSV2 な  
 れる。さらに、  
 植物遺伝子操作  
 山口尊之監修  
 頁に記載されて  
 C104、pU  
 用可能である。  
 DNA配列をら  
 ーまたは発現可  
 ベレーター、S  
 開始コドン；  
 の順に配置され  
 ーターは1つで  
 ーターを縦列させ  
 D. E. Laude  
 et. 216:4  
 された組換えベ  
 片を組み込むこ  
 例えばアナキス  
 is nidulans)、  
 ャム (A. guenel  
 f (A. baabaena)、  
 Oscillatoria)、  
 ヒゲモ (Calot  
 (1a)、スイゼン  
 ドリ (Brachyt  
 ynchocystis)  
 選したベクター  
 使用すること  
 成することがで  
 DNA配列と選  
 からの組換えブ

ラスミドまたは発現可能なDNA断片の造成もまた、遺伝子操作における周知の技術を用いて行なうことができ、例えば下記の文献：

- (1) T. Maniatis et al., Molecular Cloning - a Laboratory Manual - Cold Spring Harbor Laboratory 刊、
- (2) L. G. Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier 刊
- (3) Ray Wu et al., Methods in Enzymology, 101, Academic Press 刊

等の実験書に記載の方法によつて造成することができる。

たとえば、適当に選択されるベクターまたは発現可能なDNA断片に化学合成した本件ポリペプチドをコードする遺伝子、形質発現調節遺伝子を含むDNA断片、合成DNA断片を正しく組み込むことにより目的の組換えDNAが得られる。その概略を添付第1図に示す。DNA断片の連結順序は最終的に得られる組換えDNAの構造が目的とするものである限り特に制限されるものではない。

*General Procedure*

する。形質転換体はアンピシリン耐性などにより選抜した後、イムノブロッティング法により、所期の形質転換体を得られていることを確認することができる。

このようにして調製される形質転換体は、光の照射下に宿主細胞の増殖に応じたそれ自体既知の培地で培養することにより本件ポリペプチドの発現を行わせる。培地は適当量の銅及び/又は亜鉛イオンを含むことが好ましい。

アナキステイス・ニデユランスの場合、培地としてはBG-11培地、MDM培地などが適しており、また培養条件として、培養温度は一般に10~30℃、好ましくは25℃付近が適しており、またpHは通常7~8の範囲及び光度は1000~3000 luxの範囲が適している。このような条件下に培養は5~20日程度行なうことができる。また、培養は静置又は攪拌下に行なう。対数増殖期初期に1~2 mMのイソプロピル-β-D-チオガクトピラノシド (IPTG) を添加することにより誘発合成を行なつてもよい。

このようにして造成される組換えプラスミドまたは発現可能なDNA断片によつて前述したらん菌細胞を形質転換する。

得られる組換えDNAによる宿主の形質転換はそれ自体既知の方法によつて行なうことができる。

- 例えば遺伝子操作に関する多数の文献たとえば、
- (1) 高木康政ら、「遺伝子操作マニュアル」 腐食社刊、
  - (2) 高木康政ら、「遺伝子操作実験法」 腐食社刊、
  - (3) T. Maniatis et al., Molecular cloning - a Laboratory Manual - Cold Spring Harbor Laboratory 刊、
  - (4) L. G. Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier 刊

などの実験書に記載の方法従つて行なうことができる。

例えば、h-SODをコードするDNA配列を有する pK223-3 をアナキステイス・ニデユランスへエレクトロポレーション法で導入し形質転換

培養後の培養物からの産生された本件ポリペプチドの採取はそれ自体既知の方法で行なうことができる。例えば、培養後、遠心分離で細胞を集め、破砕したのち、通常知られている方法、例えば塩析、秀析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、クロマトフオーカッピング、ハイドロフォobicピンクインターアクションクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動などの操作を適宜組合せることにより本件ポリペプチドを分離回収することができる。

このようにして製造される本件ポリペプチドは、活性酸素が関与する病気、例えば慢性関節リウマチ、変形性関節炎、放射線・紫外線照射による障害、血行障害等の治療、処置、予防のための医薬や化粧品等に利用することができる。

次に実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

実施例1 (example)

- (1) h-SOD遺伝子の化学合成

(I-1) オリゴスクレオチドの合成および精製  
完全鎖長(475bp)の遺伝子を作製するために17の断片に分け(第2図参照)、17のオリゴスクレオチド(35b-61b)をDNAシンセサイザー380A(アブライド・バイオシステムズ・ジャパン社製)を用いてホスホアミダイト法により合成を行った。合成が終了したシリカゲルカラムに2mlのアンモニア水(27%以上)を0.5mlずつ15分おきに加え、オリゴスクレオチドをシリカ支持体より切り出しバイアルに捕集した。このバイアルにさらに1mlのアンモニア水を加え、キャップおよびパラフィルム等によりシールして55℃で8時間以上加熱し、塩基部分の保護基(アシル基)をはずした。恒温槽よりバイアルを取り出し室温に戻した後、キャップをはずし、減圧下で濃縮乾燥した。乾燥後、残液を200μlの0.01Mトリエチルアミン-酢酸溶液(TEAA、pH7.5)に溶解し、AM-313-ODS(山村化学研究所製)カラムを用いたHPLCでアセトニトリル0.1M TEAAの濃度勾配による溶

出を行いメインピークを分取した。分取したメインピークを減圧下で濃縮乾燥した後、80%酢酸(アセトニトリル溶液)100μlを加え、混合して室温に30分間放置することにより、5'末端のジメチルトリチル(DMTT)をはずし、OH基に変換した。30分経過後、迅速に乾燥し、残液を0.01M TEAA(pH7.5)200μlに溶解し、等容のジエチルエーテルを加え、DMTTを抽出除去した。この溶液を減圧下で濃縮乾燥した後、110μlの0.01M TEAA(pH7.5)に溶解し、再びHPLCを用いて、分取、精製を行った。分取したオリゴスクレオチドを含む溶液を減圧下で乾燥した後、10mMトリス塩酸-1mM EDTA溶液(TE、pH8.0)に溶解し、以下の実験に使用した。

(I-2) 合成オリゴスクレオチドのキナーゼによるリン酸化

精製したオリゴスクレオチドは完全鎖長ヒト型SOD遺伝子の5'末端に位置するNo.1およびNo.17を除き5'末端のリン酸化を行った。各

オリゴスクレオチド4μgを50mMトリス塩酸-10mM MgCl<sub>2</sub>-0.1M EDTA-5mMジチオスレイトール(DTT)-0.1mMスベルミジン-1.7μMATP溶液(pH7.6)1.20μlに混合し、T、ポリスクレオチドキナーゼ9単位(宝酒造社製)を添加し、37℃で15分間インキュベートした。次にATPを最終濃度1mMになるように加え、再度T、ポリスクレオチドキナーゼ9単位を添加し、37℃で25分間インキュベートした。反応後、90℃、5分間処理してT、ポリスクレオチドキナーゼを失活させた。この溶液に等容のフェノールを加え、攪拌したのち、15000rpm、4℃、2分間の遠心で水層を分取した。この水層に等容のクロロホルム-イソアミルアルコール(24:1)を加え、攪拌、遠心することによりフェノールを抽出除去した。この水層に1/6容の3M酢酸ナトリウム(pH4.8)および2.5容のエタノールを加え、-20℃で2時間以上放置した。沈殿を15000rpm、4℃、7分間遠心して集め、-20℃で冷した70%エ

タノールで2回洗浄し、減圧下でアルコール分を除いた。残液を10μlの10mMトリス塩酸-1mM EDTA溶液(TE、pH8.0)に溶解し、次の実験に使用した。

(I-3) T、DNAリガーゼによる合成オリゴスクレオチドの連結(DNAブロックI-Vの作製)

完全鎖長遺伝子合成のために17のオリゴスクレオチドを5つのブロック(I-V)に分け、T、DNAリガーゼにより連結した(第3図参照)。各ブロックを構成するオリゴスクレオチドのうち上下各ストランドの5'末端に位置するオリゴスクレオチド1.5μg、その他のオリゴスクレオチド1μgを50mMトリス塩酸-10mM MgCl<sub>2</sub>溶液(pH7.6)80μl中に混合した。この溶液を90℃、5分間加熱した後、2時間かけて4℃まで冷却し、100mMジチオスレイトール(DTT)と10mM ATPを10μlずつ加え、さらにT、DNAリガーゼ(宝酒造社製)2.5unitsを添加して4℃で15時間インキュベートした。



た。分取したメ  
 いた後、80%酢酸  
 1μgを加え、混合  
 により、5'末  
 (p)をはずし、0  
 、迅速に乾固し、  
 (pH 7.5) 200  
 エーテルを加え、  
 り溶液を減圧下で  
 ) 0.1M TEA  
 HPLCを用いて、  
 オリゴスクレオチ  
 した後、10mMト  
 E (TE、pH 8.0)  
 用した。  
 チドのキナーゼに

完全鎖長ヒト型  
 No. 1および  
 化を行った。各

アルコール分を  
 (トリス塩酸-1  
 .0)に溶解し、

による合成オリゴ  
 DNAブロック

7のオリゴスク  
 V)に分け、  
 (第3回参照)。  
 レオチドのうち  
 とするオリゴス  
 リゴスクレオチ  
 0.1M MgCl<sub>2</sub>  
 した。この溶  
 2時間かけて4  
 レイトール(D  
 ずつ加え、さ  
 製) 2.5 unit  
 ュベートした。

反応液を等容のフェノールで処理し、クロロホルム抽出を2回行いフェノールを除去した。この溶液に3倍容のn-ブタノールを加え、攪拌、遠心して濃縮し、残余のn-ブタノールをクロロホルムにより抽出除去した。この溶液に1/6容の電気泳動用マーカー(0.25%プロモフェノールブルー、0.25%キシレンシアノール、30%グリセロール)を加え、8%ポリアクリルアミドゲルにのせ、89mMトリスホウ酸-2mM EDTA (TBE、pH 8.0)緩衝液で200V、4時間電気泳動を行った。泳動後、ゲルを0.5μg/μlのエチジウムブロマイド溶液(TBE中)に15分間浸漬し、DNAの染色を行った。染色したゲルをトランスイルミネーター上にのせ、紫外線をあてて目的とするDNAを含むバンドを切り出した。このゲルを5μl用のディスプレイ注射筒に入れ、18Gの針をつけ、ゲルを針先から押し出すことにより細かく砕いた。細かく砕いたゲルを1.5μl用エッペンドルフチューブに入れ、20mM トリス塩酸-1.5mM EDTA溶液(pH 8.0)

0mM トリス塩酸-10mM MgCl<sub>2</sub>溶液(pH 7.6) 40μlに混合し、37℃で30分間インキュベートした後、4℃まで30分間で冷却した。この溶液に100mM DTT、10mM ATPをおのおの5μlずつ加え、さらにT、DNAリガーゼ(宝酒造社製) 10 unitsを添加して4℃、15時間反応させた。この反応液に等容のフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール(25:24:1)を加え攪拌、遠心して水層を得た。これに電気泳動用マーカーを1/6容加え、6%ポリアクリルアミドゲルにのせTBE緩衝液で200V、6時間電気泳動を行った。泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド染色した後、トランスイルミネーター上で目的とするDNAバンドを切り出した。切り出したゲルから(I-3)と同様にDNAを抽出し、Neosorb 20を用いて精製した。

(I-5) 完全鎖長遺伝子のクローニング

1) 完全鎖長ヒト型SOD遺伝子約1μgを120μlの50mM トリス塩酸-10mM MgCl<sub>2</sub>-0.1mM EDTA-5mM DTT-0.1mM

500μgを加え、37℃で1晩浸漬することにより目的のDNAを抽出した。抽出液にトリエチルアミンを最終濃度が10mMになるように加え、0.1M トリス塩酸-10mM トリエチルアミン-1mM EDTA溶液(pH 7.7)で平衡化した核酸精製用カートリッジNeosorb 20 (Du pond社製)に通すことによりDNAを吸着させた。カートリッジに3μlの0.1M トリス塩酸-1M EDTA溶液(pH 7.7)および滅菌水を流して洗浄した後、DNAを50%メタノール(高速液体クロマト用)溶液として溶出した。溶出液を減圧下で濃縮乾固した後、残渣を10μlの滅菌水に溶解した。

(I-4) T、DNAリガーゼによるブロックの連結-完全鎖長遺伝子の作製

前記(I-3)で連結した5つのDNAブロック(I、II、III、IV、V)を第3図に示すように2つずつT、DNAリガーゼにより連結し、完全鎖長のヒト型SOD遺伝子を作製した。

両合せの2ブロックをそれぞれ0.5μgずつ5

スベルミジン-1.7μM ATP溶液(pH 7.6)と混合し、T、ポリスクレオチドキナーゼ(宝酒造社製) 9 unitsを添加し、37℃、15分間インキュベートした。次にATPを最終濃度1mMになるように加え、再度T、ポリスクレオチドキナーゼ9 unitsを添加し、37℃で25分間インキュベートした。反応後、等量のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1)を加え攪拌したのち15000rpm、2分間の遠心で水層を得た。この水層に等量のクロロホルムを加え攪拌、遠心することにより残余のフェノールを抽出除去した。この水層に1/6容の3M 酢酸ナトリウム(pH 4.8)および2.5容のエタノールを加え、-20℃で2時間以上放置した。沈殿を15000rpm、4℃で7分間遠心して棄め-20℃に冷した70%エタノールで2回洗浄し、減圧下でアルコール分を除いた。こうして0.8μgのリン酸化ヒト型SOD遺伝子が得られ、40μlのTEに溶解し、次の実験に使用した。

2) リン酸化ヒト型SOD遺伝子30ngおよ

び制限酵素、HindIII、BamHIで切断したpUC13 280ngを7.5μlの0.1Mトリス塩酸-5mM MgCl<sub>2</sub>溶液に混合し、60μlのTakara ligation Kit(空酒造社製)A液を加え、よく攪拌した。この溶液に7.5μlのligation Kit B液を加えよく攪拌した後、16℃で30分間インキュベートした。反応後、この溶液をE. coli JM109株の形質転換に使用した。

3) ヒト型SOD遺伝子を挿入したpUC13 40ng(10μl)に50mM CaCl<sub>2</sub>処理したE. coli JM109株の細胞懸液200μlを加え、おだやかに混合した。混合液を氷水中で30分間インキュベートした後、さらに42℃で3分間インキュベートしてDNAを細胞中にとりこませた。この懸液に1mlの2XYTmedium(16g/lバクトトリプトン、10g/l酵母抽出エキス、5g/l NaCl)を加え、振盪しながら37℃で1時間インキュベートした。この細胞懸液を25、50、100、200および400μlとり2XYT寒天培地(50μg/mlアンピシリン、

酢酸ナトリウム、0.3mM EDTA、pH4.8)を加えボルテックスミキサーで十分混合した。これに350μlの溶菌液(1%SDS、0.2N NaOH)を加え、チューブを逆さにすることによりおだやかに攪拌し、完全に溶菌させた。この溶菌液を氷水中で10分間インキュベートした後、250μlの酢酸ナトリウム(pH4.8)を加え、十分混合し、さらに氷水中に30分間放置した。この混合液を15000rpm、4℃で10分間遠心してSDSおよび染色体DNAを沈殿として除いた。上清を別のエッペンドルフチューブに移し、等量のイソプロパノールを加えよく混合し、15000rpm、4℃で7分間遠心してプラスミドDNAを沈殿として集めた。沈殿を菌水に溶解し、一部を制限酵素HindIII、BamHI処理し、1.2%Agaroseゲル電気泳動を行い475bpのDNA断片がpUC13に導入されていることを確認した。このようにして得られた組換えプラスミドをpUC13-h-SODと命名する。

#### II. h-SOD発現用ベクターの構築

40ng/45-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-チオガラクトシド(X-gal)、23、83ng/4イソプロビル-β-D-チオガラクトシド(IPTG)、1.5%寒天を含む)上にプレートした。このプレートを37℃で24時間インキュベートし、得られた白いコロニーを新しい2XYT寒天培地(アンピシリン、X-gal、IPTG、1.5%寒天を含む)にスポットして37℃で1晩培養することにより単離した。

単離した白いコロニーを2mlの2YT溶液培地(50μg/mlアンピシリンを含む)に白金耳で植え付け37℃で1晩培養した。培養液を1mlとり1.5容エッペンドルフチューブに移し、15000rpm、30秒間遠心して細胞を集めた。集めた細胞を1mlのSET buffer(20%ショ糖、50mMトリス塩酸、50mM EDTA、pH7.6)に懸濁し、15000rpm、1分間遠心して洗浄した。この細胞を再び150μlのSET bufferに懸濁し、5μlのRNase溶液(10ng/mlリボスクレアーゼA(シグマ社製)、0.1M

#### (II-1) h-SOD遺伝子の調製

pUC13-h-SOD DNAをSDS-アルカリ法および塩化セシウム-エチジウムブロマイド平衡密度勾配遠心分離法(B. Perbal, A. Practical Guide to Molecular Cloning 140-144, John Wiley and Sons Inc, 刊)により大量に調製した。調製したpUC13-h-SOD DNA 80μl(40μg)と5×HindIII切断用バッファー(50mMトリス塩酸、35mM MgCl<sub>2</sub>、300mM NaCl、pH7.5)30μl及びHindIII(空酒造社製)80unitsに水を加えて150μlとしたエッペンドルフチューブ(1.5ml用)を10本用意し、37℃で3時間反応させた。反応後、フェノール:クロロホルム(1:1)、クロロホルム処理し、1/6容の3M酢酸ナトリウム(pH4.8)、2.5容のエタノールを加え、-20℃で2時間以上放置した。生じたDNAの沈殿を15000rpm、4℃で10分間遠心し、70%エタノールで洗浄後、減圧乾固させた。残液を550μlの滅菌水

に溶解し、5つのチューブに110 $\mu$ ずつ分注した。それぞれのチューブに5 $\times$ EcoRI切断用バッファー(250 $\mu$ Mトリス塩酸、35 $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>、500 $\mu$ M NaCl、35 $\mu$ M 2-メルカプトエタノール、0.05%ウシ血清アルブミン) 30 $\mu$ 及びEcoRI(宝酒造社製)100 unitsに水を加えて150 $\mu$ とし、37 $^{\circ}$ で3時間反応させた。反応後、フェノール:クロロホルム(1:1)処理エタノール沈澱してDNAを回収した。目的とするh-SOD遺伝子(HindIII-EcoRI、約500bp)を2%アガロースゲルによる電気泳動を行って分離し、核酸精製用カートリッジ Nensorb20(Dupond社)を用いて精製した。

#### II-2. HincII-HindIII断片の合成

Shine Dalgarno(S/D)配列を含む発現調節領域の合成のために4つのオリゴヌクレオチド(第4図参照)をホスホアミダイト法により化学合成し、高速液体クロマトグラフィーにより精製した。5'末端をT,ポリヌクレオチドキナーゼとATPでリン酸化し、C<sub>1</sub> 1.53 $\mu$ g、C<sub>2</sub>

間熱処理して反応を止めた。目的のDNA断片(約570bp)を2%アガロースゲル電気泳動によって分離し、DNA精製用キットGeneclean<sup>®</sup>(Bio101社製)を用いて精製した。

#### (II-4) lacプロモーター遺伝子の調整

lacプロモーターを有する大腸菌発現用ベクター-pKK223-3(ファルマシア社より購入)をSDS-アルカリ法と塩化セシウム-エチジウムブロマイド平衡密度勾配遠心法により大量調製した。pKK223-3DNA溶液30 $\mu$ l(80 $\mu$ g DNA)、5 $\times$ BamHI切断用バッファー(50 $\mu$ Mトリス塩酸、35 $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>、500 $\mu$ M NaCl、10 $\mu$ M 2-メルカプトエタノール、0.05%ウシ血清アルブミン、pH8.0) 40 $\mu$ l及びBamHI(宝酒造社製)240 unitsに水を加えて200 $\mu$ としたエッペンドルフチューブ10本を用意し、30 $^{\circ}$ で3時間反応させた。反応後、フェノール:クロロホルム、クロロホルム処理し、DNAをエタノール沈澱して回収した。目的のDNA断片(269bp)を2%アガ

1.83 $\mu$ g、V1 0.73 $\mu$ g、V2 0.56 $\mu$ gを80 $\mu$ lの50 $\mu$ Mトリス塩酸-10 $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>溶液に混合した。この溶液を90 $^{\circ}$ で5分間加熱した後、2時間かけて4 $^{\circ}$ まで徐冷し、100 $\mu$ Mジチオスレイトール、10 $\mu$ M ATPを10 $\mu$ ずつ加え、さらにT<sub>4</sub>DNAリガーゼ(酒造社製)2.5 unitsを添加して4 $^{\circ}$ で15時間インキュベートした。反応液をフェノール:クロロホルム、クロロホルム処理し、DNAをエタノール沈澱して回収した。

#### (II-3) h-SOD遺伝子(HindIII-EcoRI)と合成DNA断片(HincII-HindIII)の連結

II-2で調製した合成DNA断片(HincII-HindIII)0.6 $\mu$ gとh-SOD遺伝子4.1 $\mu$ gを50 $\mu$ Mトリス塩酸-10 $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>-10 $\mu$ Mジチオスレイトール-1 $\mu$ M ATP溶液(pH7.6)に混合し、T<sub>4</sub>DNAリガーゼ3 $\mu$  unitsを添加して20 $\mu$ とした。この反応液を10 $^{\circ}$ で15時間インキュベートした後、65 $^{\circ}$ で10分

間熱処理して反応を止めた。目的のDNA断片(約570bp)を2%アガロースゲル電気泳動により分離し、ゲルからDNAを電気的に溶出し、核酸精製用カートリッジ Nensorb20(Dupond社製)を用いて精製した。精製したDNA断片8 $\mu$ gを5 $\times$ HincII切断用バッファー(50 $\mu$ Mトリス塩酸、35 $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>、300 $\mu$ M NaCl、35 $\mu$ M 2-メルカプトエタノール、pH8.0)9 $\mu$ l及びHincII(宝酒造社製)30 unitsにH<sub>2</sub>Oを加えて45 $\mu$ として、37 $^{\circ}$ で2時間反応させた。反応後、65 $^{\circ}$ で10分間熱処理し、2.5%アガロースゲル電気泳動して、目的のDNA断片(191bp)を分離し、Nensorb20を用いて精製した。

#### (II-5) lacプロモーター遺伝子(BamHI-HincII)とHincII-EcoRI断片の連結

lacプロモーター遺伝子(191bp)0.5 $\mu$ g、HincII-EcoRI断片1.5 $\mu$ gを10 $\mu$ Mトリス塩酸-1 $\mu$ M EDTA-300 $\mu$ M NaCl溶液(pH8.0)9.68 $\mu$ lに混合し、Takara ligation kit(宝酒造)B液9.68 $\mu$ lを加え、2

6℃で1時間反応させた。反応後、DNAをエタノール沈澱して回収した。得られたDNAを20μlのBamHI 100倍希釈用バッファー(10mM トリス塩酸、7mM MgCl<sub>2</sub>、100mM NaCl、2mM 2-メルカプトエタノール、0.01%ウシ血清アルブミン、pH 8.0)に混合し、BamHIにunitsを加え、30℃で2時間反応させた。反応後、60℃で10分間熱処理して反応を停止させた。

#### (II-6) プラスミド(pKK223-3)のアルカリフوسفターゼ処理

pKK223-3をBamHI処理して得られた約4320bpのDNA断片10μgを100μlの50mM トリス塩酸(pH 8.0)に混合し、10μlのアルカリフوسفターゼ溶液(0.5unit sアルカリフوسفターゼ(宝酒造社製)、10mM トリス塩酸、50mM NaCl、1mM ZnSO<sub>4</sub>、pH 7.5)を加え、37℃で1時間インキュベートした。反応後、さらに10μlのアルカリフوسفターゼ溶液を加え65℃で15分間

でO.D.600=0.3~0.5まで培養した大腸菌JM105株を8000rpm、4℃で5分間遠心して集め、25μlの10mM NaClで洗浄した。洗浄後、細胞を25μlの冷たい50mM CaCl<sub>2</sub>に懸濁させた。この懸濁液を氷水中に20分間放置した後、ただちに細胞を遠心して(5000rpm、10分)集めた。集めた細胞を再び5μlの冷たい50mM CaCl<sub>2</sub>におだやかに懸濁し、4時間氷冷することによりコンピテント細胞を得た。このコンピテント細胞懸濁液200μlに50ngのpKKh-SOD10を加え、0℃で60分間、ついで42℃で2分間熱処理し、ベクターを細胞に取り込ませた。この細胞液に2μlのLB培地を加え、37℃で1時間振盪培養した後、50μg/μlのアンプシリンを含む2YT寒天培地(16g Bacto トリプトン、10g Bacto酵母抽出液、5g NaCl、1.5%寒天)にプレーティングし、37℃で1晩培養した。このようにして得られたコロニーからプラスミドを調製し、制限酵素地図を解析することによって目的のプラスミ

ドをインキュベートし、2μlの250mM EDTAを加え反応を停止させた。DNAはエタノール沈澱して集め0.2μg/μlになるように10mM トリス塩酸-1mM EDTA(TE、pH 8.0)に溶解し、次の実験に使用した。

#### (II-7) pKK233-3とBamHI-BamHI(プロモーターとh-SOD遺伝子)の連結

BamHI-BamHIフラグメント(II-5で調製)50ng、pKK223-3(II-6で調製)280ngを11.4μlのTEに混合し、45.6μlのTakara ligation Kit A液および11.4μlのB液を加えて16℃で2時間反応させた。反応後、この液をE.coli JM105株の形質転換に用いた。

#### III. pKKh-SOD10の大量調製

##### (III-1) pKKh-SOD10による大腸菌JM105株の形質転換

50μlのLB培地(10g Bacto トリプトン、5g Bacto 酵母抽出液、10g NaCl)

を保持していることを確認した。

#### IV. h-SOD geneのラン藻 Anacystis nidulans 6301、R2による発現

##### (IV-1) A. nidulans 6301(Synnechococcus PCC 6301)およびR2株(Synnechococcus PCC 7942)の形質転換

75μlの液体培地(BG-11\*)で15~30日間培養した細胞を8000rpm、5分間遠心して集め、75μlの新しい培地に移す。これを光照射下で1~3日間培養する。この細胞を8000rpmで5分間遠心して集め、1mM HEPES(pH 7.0)20μlおよび10μl、さらに形質転換用緩衝液(272mM シュガー、3mM リン酸カリウム(pH 7.4)、15%グリセロール)5μlで遠心洗浄する。得られた細胞のペレットを形質転換用bufferに懸濁し、10<sup>10</sup>cells/μl以上の濃度(好ましくは2.×10<sup>10</sup>cells/μl)に調整し、形質転換用試料とした。

形質転換は津島製作所社製細胞融合装置SSH-

1を用いたエレクトロレーション法によって行った。上記に調製した試料を50μlずつエフベンドルフチューブに分注し、氷冷する。これに1~2μlのDNA溶液(純濃度が20~30μg/μlになるようにKKh-SOD10をTE緩衝液に溶解したものを加え、攪拌したのち、エレクトロチャンパーに移す。ただちに500μsec、7.5kV/cmの条件でパルスをかけ、DNAを細胞中にとりこませる。パルス処理した細胞をすばやく1.9mMのBG-11培地に移し、暗所で1晩振盪培養する。この細胞を100~200μlずつBG-11寒天培地(1mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、1.0μg/μlアンピシリン、1.5% agarを含む)にまき、光照射下(2000ルクス)で7~10日間培養する。出現してまたコロニーを新しい寒天培地に移し、h-SODの発現を調べる。

\*BG-11培地の組成(1ℓ中)

NaNO <sub>3</sub>	1.5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40mg
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	75mg

この膜を0.5%グルタルアルデヒド、0.05%ノニデットP-40を含む10mM PBSに4℃で1晩処理することにより膜上のタンパクの固定を行った。

膜に固定されたA. nidulansタンパク中のh-SODを抗h-SODを用いた酵素抗体により検出した。上記の膜を5%スキムミルク、0.1%ツイーン20を含むTBS(20mMトリス塩酸、0.9% NaCl、pH 7.4)に37℃で2時間処理した。この膜を洗浄液(0.1% BSAを含むTBS)で15分間(5分×3)洗い、1/1000抗h-SOD(ヤギIgG、Binding Site社製)、1% BSAを含むとともに室温で2時間インキュベートする。次に、同様に膜を洗浄した後、1/1000ペルオキシダーゼ抗ヤギIgG(Cappel社製)、1% BSAを含むTBSで室温、2時間インキュベートした。膜を洗浄液で20分間(5分×4)洗浄した後、10μgジアミノベンチジン(DAB)、15μlの32% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含む40μlの0.1M トリス-塩酸(pH 7.4)で染色させた。

CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	36mg
EDTA	1mg
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5mg
クエン酸アンモニウム鉄	6mg
クエン酸	6mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86mg
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1.81mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.222mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.021mg
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.08mg
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.0295mg

(IV-2) h-SODの検出

形質転換で得られたコロニーを培養した寒天プレート上に1mMイソプロピル-β-D-チオガラクトシド(IPTG)を含むBG-11をしみこませたニトロセルロース膜(アマシャム社製、HybondC)をのせ、光照射下で1日培養した。培養後、はがしたニトロセルロース膜を0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含む50%メタノールに20分間ひたし、内性のペルオキシダーゼを失活させた。さらに、

その結果、100個のコロニーのうち23個のコロニーが茶褐色に染まり、h-SODの発現を確認した。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は組換プラスミドの調製のための製造工程図であり、

第2図はh-SOD遺伝子の化学合成における該遺伝子のDNA断片の塩基配列図であり、

第3図はh-SOD遺伝子の作製方法を示す工程図であり、

第4図は発現調節領域の合致のための工程図である。

特許出願人 萩原 義 秀

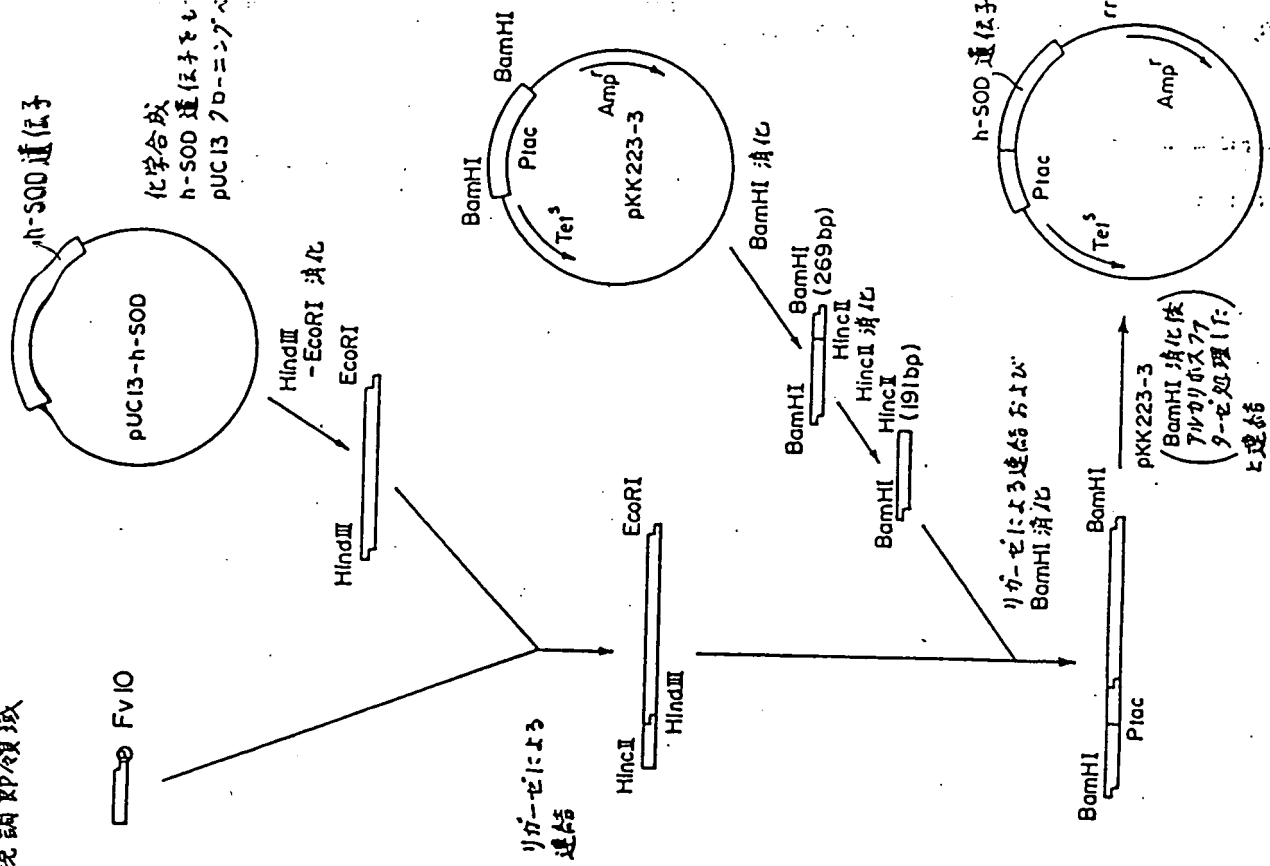
同 東京薬品開発株式会社

代理人 弁理士 小田島 平 吉

同 弁理士 江 角 洋 治



発現調節領域



オリゴヌクレオチドの化学合成

1  
A GCTTATGGCT ACCAAAGCTG TTTGCGTCT GAAAGGTGACGGCCCCGGTTC AGGGTATC AT CAACTTCGAA CAGAAAGAAT CTAACGGTCCG  
 2  
 ATACCGA TGGTTTCGAC AAACGCAAGA CTTCCAC TGGCGGCCAAG TCCCATAGTA GTTGAAGCTT GTCTTCTTA GATTGCCA  
 9 10

3  
 GTTAAAGTTTGGGGTCTA TCAAAGC CT GACCGAAGGT CTGCATGGAT TCCATGTCA TGAATTTGGTGACAACACTG CAGGTTC AC C  
 GG CCAATTTCAAACCCCAAGAT AGTTTCCGGA CTGGATTCCA GACGTACCTA AGGTACAAG T ACTTAAACCCTGTGTGAC GTCCAACCTG  
 11

4  
 TCTGCAGGG CCTCATTCA ACCCGCTGTC GCGTAAACATGGTGGGCCGA AAGACGAAGA ACG TCATGTT GGTGACTAGG TAACGTTACC G  
 GAGACGTCCC GGAGTAAAGT TGGGCGA CAG CGCATTGTACCACCCGGCT TTCTGCTTCT TGCAGTACAA CCACTGATCC ATTGCAA  
 12 13

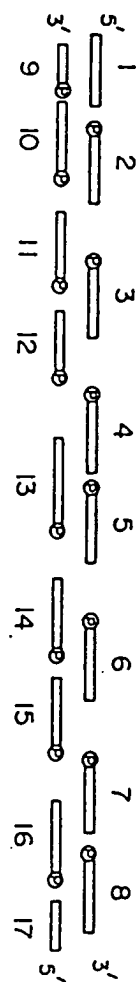
5  
 CTGACAAAGACGGTGTCCG TGACGTT TCT ATCGAAGACT CTGTTATCTC TCTGTCTGGT GACCATTGCATCATCGGTTCG TACTCTG GT  
 TGG CGACTGTTTCTGCCACAGCG ACTGCAAAGA TAGCTTCTGA GACAATAGAG AGACAGA CCA CTGGTAACTAGTAGCCAGC ATGAGAC  
 14

6  
 GTTCATGAAA AAGCGGATGA CCTGGGTAAA GGTGTAACGAGGAATCTAC CAAAACC GGT AACGCTGGTT CTCGTCTGGC ATGCGGTGTT  
 CAA CAAGTACTTT TTCGCTACT GGACCCA TTT CCACCATTGCTOCTTAGATG GTTTTGGCCA TTGCGACCAA GAGCAGACCG TACG  
 15 16

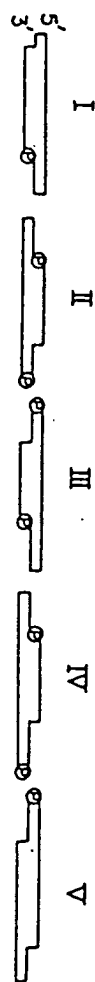
7  
 ATCGGTATCGCTCAGTAGTG AG  
 CCACAA TAGCCATAGCGAGTCATCAC TCCTAG  
 17

第3図

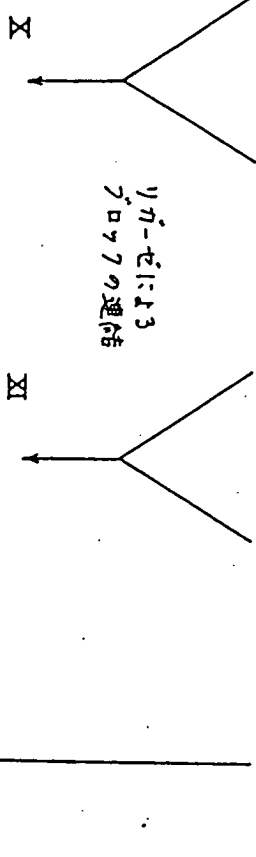
オリゴヌクレオチドの化学合成と5'末端のリン酸化



リン酸とリカーゼによる  
連結 (クロマグの合成)

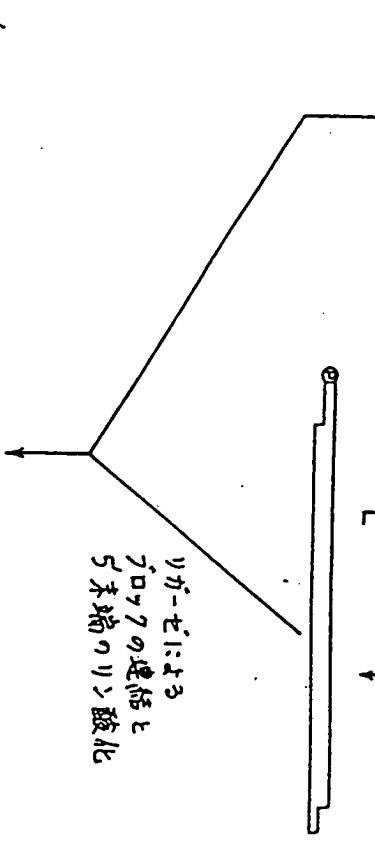


リカーゼによる  
クロマグの連結



リカーゼによる  
クロマグの連結

リカーゼによる  
クロマグの連結と  
5'末端のリン酸化



第4図

